

Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS UNTERSCHIEDLICH
HERGESTELLTER SCHWEINELEBEREXTRAKTE AUF DIE ENT-
WICKLUNG VON CHABERTIA OVINA-LARVEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Gröning
Tierarzt aus Berlin
Berlin 1969
Journal Nr. 670



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550805_0034

Aus dem Institut für Parasitologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. J. Boch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS UNTERSCHIEDLICH
HERGESTELLTER SCHWEINELEBEREXTRAKTE AUF DIE ENT-
WICKLUNG VON CHABERTIA OVINA-LARVEN IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Gröning
Tierarzt aus Berlin
Berlin 1969
Journal Nr. 670

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen
Fakultät der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. K. Bronsch
Referent: Prof. Dr. J. Boch
Korreferent: Prof. Dr. Merckenschlager



Tag der mündlichen Prüfung: 9. 7. 1969

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I Einleitung	1
II In vitro-Züchtung von Nematoden unter Verwendung von Leberextrakten (anhand der Literatur)	2
III Eigene Untersuchungen	10
A. Material und Methodik	10
B. Ergebnisse	17
1. Bedeutung der Vorbehandlung der Leber durch unterschiedliche Lagerung vor der Extraktgewinnung	17
2. Einfluß der verschiedenen Extraktionsmittel auf die Wirksamkeit des Extraktes	17
3. Bedeutung der Menge des zum Kulturmedium zugesetzten Leberextraktes	20
4. Wirkung von rohen und autoklavierten Leberextrakten	25
5. Entwicklung im Grundmedium ohne Leberextrakt	26
IV Besprechung der Ergebnisse	26
V Zusammenfassung	30
VI Literaturverzeichnis	31
Lebenslauf	

I. Einleitung

Parasitische Nematoden durchlaufen in ihrer Entwicklung eine exogene (präparasitische) und eine endogene (parasitische) Phase. In der Außenwelt entwickeln sich die mit dem Kot des Wirtstieres ausgeschiedenen Wurmeier über 2 Larvenstadien zu infektionstüchtigen Larven III bei Anwesenheit von Sauerstoff, Feuchtigkeit und Wärme. Während die für diesen Teil der Entwicklung erforderlichen Umweltfaktoren für den größten Teil der bei Wiederkäuern parasitierenden Nematoden untersucht sind, kennt man die verschiedenen Wachstumsstufen und Stoffwechselvorgänge im Wirtstier gar nicht oder nur unvollständig. Hierfür zeigt die in vitro - Kultur neue Forschungsmöglichkeiten auf.

Seit mehreren Jahren werden im Institut Versuche durchgeführt, verschiedene Trichostrongyliden- und Strongylidenarten der Schafe in künstlichen Medien bis zur Erreichung des adulten Stadiums zu züchten. Dabei wurden den Kulturmedien Leberextrakte zugesetzt, deren Wirksamkeit allerdings recht unterschiedlich war. Ich erhielt deshalb die Aufgabe, die Effektivität von mit verschiedenen Methoden hergestellten Leberextrakten auf die in vitro - Kultur von *Chabertia ovina* - Larven zu untersuchen.

II. In vitro - Züchtung von Nematoden unter Verwendung von Leberextrakten (anhand der Literatur)

Seit längerer Zeit schon beschäftigen sich Parasitologen mit der Züchtung von parasitischen Würmern in künstlichen Medien. SILVERMAN (1965) hat die Arbeiten aus neuerer Zeit über in vitro-Züchtungsversuche von parasitischen Helminthen ausführlich zusammengestellt. Dabei sind die Kulturmedien nur teilweise chemisch definiert, meist stellen sie ein Gemisch von empirisch gefundenen chemischen und biologischen Bestandteilen dar. Fast in allen Fällen aber wurde Leberextrakt verwendet.

STOLL stellte schon 1940 fest, daß die Häutung der Larve III von Haemonchus contortus in Tyrode-Lösung schneller vor sich ging, wenn Leberextrakt zugesetzt wurde. Am günstigsten war eine Konzentration, die einer Menge von 0,05 - 0,20 g Leber pro ml Medium entsprach.

DOUGHERTY (1950) sowie DOUGHERTY und Mitarb. (1950) berichten über die erfolgreiche Kultivierung von Rhabditis briggsae in einem modifizierten Kidder-Dewey-Medium, das mit Kükenembryoextrakt versetzt war. Trotz guten Wachstums fand aber keine Vermehrung statt. Es wird angenommen, daß ein eiweißähnlicher hitzelabiler Faktor aus dem Embryoextrakt (Rb-Faktor) wachstumsfördernd für Rhabditis briggsae ist. DOUGHERTY (1951) fand diese hitzelabile proteinähnliche Gruppe von Substanzen auch in wäßrigem Leberextrakt sowie zum Teil in menschlichem Serum. Dieser Rb-Faktor war nicht dialysierbar, ließ sich aber aus dem wäßrigen Leberextrakt mit Ammoniumsulfat bei 75 %iger Sättigung aussalzen (Fraktion I des Präzipitats). Der nicht präzipitierende Teil des Leberextraktes (Fraktion II) enthielt diesen Faktor nicht und tötete die Rhabditis-Larven nach einigen Tagen sogar ab. Kidder-Dewey-Medium, das mit Fraktion I des Leberextraktes versetzt war, begünstigte die Rhabditis briggsae-Kultur.

Noch bessere Ergebnisse wurden aber mit einem Medium aus autoklaviertem Leberextrakt (ALE) und der Fraktion I erzielt. Durch unterschiedliche Behandlung der Leberextrakte, z.B. mit

0,1 n HCl, mit 0,1 n NaOH, mit 8 molarer Harnstofflösung oder mit Pepsin bzw. durch fraktioniertes Aussalzen mit Ammoniumsulfat kam DOUGHERTY (1953) zu dem Ergebnis, daß der Rb-Faktor in unerhitztem wäbrigem Leberextrakt der Denaturierung durch Harnstoff sowie wenigstens zum Teil der Behandlung mit 0,1 n Säure oder 0,1 n Base unter den gegebenen Testbedingungen widerstand. Von den durch Aussalzen gewonnenen Fraktionen hatte LPF-C (Liver-protein-fraction C), die bei einer Sättigung von 40 - 60 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ präzipitierte, im frischen Zustand die meiste Aktivität. Dagegen war die bei 20 - 40 %iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung gewonnene Fraktion LPF-B erst nach einer Lagerung von 2 und mehr Monaten bei 4°C aktiver als die frische LPF-C-Fraktion. Beide Fraktionen begünstigten die Entwicklung von *Rhabditis briggsae* nur dann, wenn Kohlehydrate, Vitamine und Mineralsalze hinzugefügt wurden. Ein Medium mit pepsinverdaulichem Leberextrakt hatte dagegen keine wachstumsfördernde Wirkung. NICHOLAS und Mitarb. (1959) berichteten von einer großen Stabilität des Rb-Faktors. Bei 3jährigem Einfrorensein oder bei einer über 1jährigen Lagerung bei 4°C trat kaum ein Aktivitätsverlust ein. Mit Ficin oder Folsäure versetzte ALE (autoklavierte Leberextrakte) hatten ebenfalls einen wachstumsfördernden Effekt. Als ein günstiges Kulturmedium erwies sich ferner die Kombination von Kükenembryoextrakt (CEE) und ALE, wobei häufig auch LPF-C noch zugesetzt wurde. Allerdings scheiterten bis heute alle Versuche, die komplexen Materialien (Leber- und Kükenembryoextrakte) durch chemisch definierte Medien zu ersetzen. Vermutlich enthalten die undefinierten Gewebsextrakte noch zusätzlich Stoffe, welche die Helminthen-Entwicklung besonders begünstigen.

DOUGHERTY und Mitarbeiter (1956 und 1959) versuchten später, *Rhabditis briggsae* in chemisch definierten (modifiziertes Gordon-Medium = GM) allein oder versetzt mit chemisch undefinierten Zusätzen zu züchten. Während in GM allein nur ein geringes Wachstum stattfand, förderte ein Zusatz von Lebermedium (LPF-C und ALE) das Wachstum der ersten und nachfolgenden Generationen erheblich. Der verwendete Leberextrakt wurde aus Schweineleber gewonnen.

Auch SAYRE und Mitarb. (1961) konnten durch Aussalzen und Säulenchromatographie aus Pferdeleberextrakt eine aktive Fraktion isolieren, in deren Hydrolysat sich 12 Aminosäuren nachweisen ließen. Das bei 40 - 60 %iger Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aus dem Leberextrakt ausgefällte Präzipitat ergab nach Trennung an einer Hydroxylapatitsäule 6 Fraktionen, davon allerdings nur eine mit biologischer Aktivität. Ein proteinfreies, chemisch definiertes Basalmedium, dem diese aktive Fraktion zugegeben wurde, erbrachte eine deutliche Vermehrung von *Rhabditis briggsae*, dagegen das Basalmedium allein nur ein begrenztes Wachstum der Larven.

HANSEN und Mitarb. (1966) konnten in einem definierten Medium, dem sie einen aus Wirbeltiergewebe stammenden und durch Gefrieren aktivierten, allerdings nicht näher bezeichneten Wachsfaktor (Protein) zusetzten, eine teilweise Entwicklung von Haemonchus contortus erreichen.

Bei dem Versuch von WEINSTEIN und JONES (1956), Nippostrongylus muris nur in Kükenembryoextrakt zu züchten, war der Erfolg gering. Dagegen entwickelten sich in einem Medium, das Kaseinat oder Kaseinhydrolysat, ein Filtrat von pulverisiertem Hefeextrakt bzw. einem käuflichen Leberkonzentrat, ferner Kükenembryoextrakt oder Saugerserum enthielt, die Larven sogar bis zum 5. Stadium und zwar in einer etwa 3mal längeren Zeit als in vivo. Reife Weibchen mit Eiern bzw. Männchen mit Spermien beobachteten sie jedoch nur in demjenigen Medium, das Kaseinat, ein käufliches Leberkonzentrat, Kükenembryoextrakt und Ratten-serum enthielt. Eine bakterielle Verunreinigung der Kulturen wurde durch Antibioticazusatz ausgeschaltet. Aber auch nach höheren Zugaben von Kükenembryoextrakt (40%) und 20 % Serum zum Medium erreichten 40 % der *Nippostrongylus muris*-Larven das 5. Stadium, wobei ein Teil der Weibchen unreife Eier enthielt. WEINSTEIN und JONES (1957) verzichteten dabei ganz auf Leberextrakt und Kaseinat. Bei Zusätzen von 10 - 20 % Serum zum Kükenembryoextrakt durch dieselben Autoren (1959) entwickelten sich ebenfalls 5. Stadien von *Nippostrongylus muris*. Dagegen trat bei höheren Zusätzen fast keine Entwicklung mehr ein. Durch Zugabe von 0,1 % käuflichem Leberkonzentrat zu einem Basalmedium, bestehend aus 70 % Kükenembryoextrakt und 20 %

Rattenserum, wurde etwa die gleiche Entwicklungsrate von 5. Stadien festgestellt, wie bei der Zugabe einer Vitaminkombination. Zugaben von 0,3 % und 0,5 % Leberkonzentrat hemmten die Entwicklung der bei 37,5°C bebrüteten und mit Luft begasten Kulturen.

In einem Medium aus Kükenembryoextrakt, versetzt mit einem käuflichen Leberkonzentrat, konnten JONES und WEINSTEIN (1957) auch eine in vitro-Entwicklung von Nematospiroides dubius zu Larven V beobachten.

STOLL (1953, 1959) züchtete in einem Medium aus Kalbfleisch- oder Rinderherzbrühe, rohem Leberextrakt (RLE) und Dextrosezusatz erfolgreich *Neocaplectana glaseri*. Der Leberextrakt, den er aus Kaninchen- oder Schweineleber gewann, die vor der Verarbeitung mehrere Tage im Kühlschrank gelagert wurde, ist während des Entwicklungsvorganges mit 0,1 n HCl auf einen pH-Wert von 4,1 - 4,2 eingestellt worden. Nach 1 - 2 Wochen Aufbewahrung bei 2 - 4°C bildete sich ein Präzipitat, das die meiste Aktivität des RLE enthielt. Versuche mit Zusätzen unterschiedlicher RLE-Mengen zur Brühe ergaben, daß in reinem RLE sich die Larven nur teilweise, bei einem Verhältnis von 9 Teilen Brühe und 1 Teil RLE jedoch sehr günstig entwickeln.

Untersuchungen über die Aktivität des Präzipitats zeigten, daß 10 % Präzipitatzusatz allein die besten, RLE mit Präzipitat noch gute und RLE ohne Präzipitat die schlechtesten Ergebnisse erbrachten; denn bei einer Ausgangszahl von 25 Würmern waren die Wurmzahlen nach 3 Wochen um das 172-fache, das 151-fache und das 46-fache gestiegen. Zwei käufliche Leberextrakte bewährten sich nicht. Interessanterweise erwies sich Kaninchenleber zur Extrakterstellung als am besten geeignet gegenüber den Lebern von Schwein, Scharf, Rind und Huhn. Auch die Dauer der Lagerung des Leberextraktes bei 2 - 4°C beeinflusst seine Wirkung (STOLL, 1959 und 1961; DOUGHERTY, 1953); optimal waren 16 - 90 Tage, wobei die Präzipitatbildung erfolgt sein mußte. Ferner sollten Extraktion und Seitzfiltration möglichst innerhalb einer Stunde bei Temperaturen unter 15°C ablaufen.

Eine besonders gute Aktivität zeigten Extrakte solcher Lebern, die von hochträchtigen (4 Wochen) Kaninchen oder von Muttertieren kurze Zeit nach dem Satz stammten. So entwickelten sich in einem Kulturmedium aus Rinderherzbrühe mit 1 % Pepton und Dextrose bei Zusatz von 10 % eines derartigen Leberextraktes innerhalb von 3 Wochen 10800-11900 Würmer im Vergleich zu 4400-5400, wenn der RLE von einem nichtträchtigen Weibchen oder von einem Männchen stammte.

JACKSON (1962) gelang schließlich die Entwicklung von *Neoapectana glaseri* in einem Medium, das aus Arnold'scher Pepton-Fleischbrühe mit 10 % RLE-Zusatz (aus einer von einem trächtigen Kaninchen stammenden Leber) bestand. In einer 8,3 %igen Lösung eines käuflichen Rinderleberextraktes dagegen entwickelten sich die Larven zwar zu reifen Würmern, deren Nachkommen aber blieben dann auf dem 3. Larvenstadium stehen.

DIAMOND und DOUVRES (1960,1962) verwendeten für die in vitro-Kultur von *Hyostrongylus rubidus* und *Oesophagostomum quadrispinulatum* ein Medium, das aus Kaninchenembryoextrakt, rohem Schweineleberextrakt, Schafserum und einer Nährbrühe bestand. Dem Medium war ferner Penicillin, Streptomycin und Mycostatin zugesetzt. Für die Gewinnung der Leber- und Embryoextrakte benutzten sie 0,02 n HCl als Extraktionsmittel. Das fertig zusammengestellte Medium mit 15 % RLE wurde über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Tag vor der Verwendung zentrifugiert, um das über Nacht entstandene Präzipitat zu entfernen, dem STOLL (1959) ja eine besondere Aktivität zuschrieb. Bei einer Temperatur von 38,5°C, einem pH von 6,5, einer Mediumerneuerung an jedem 2. Tag und ab 6. Tag nur wöchentlich, entwickelte sich in den Röhrchenkulturen *Oesophagostomum quadrispinulatum* zur Larve IV und *Hyostrongylus rubidus* zur praeadulten Form innerhalb von 43 Tagen. Auch *Oesophagostomum radiatum* erreichte in ähnlichen Medien, denen zum Teil Vitamine zugesetzt waren, innerhalb von 31 Tagen die 4. Häutung. Eine Bebrütungstemperatur von 38,5°C erwies sich als am günstigsten. Keinen Einfluß auf die Entwicklung im selben Mediumtyp hatten Seren infizierter bzw. nichtinfizierter Kälber, Leberextrakte von Schweinen unterschiedlichen Alters (3 und 9 Wochen) sowie 1 Woche bis 6 Monate alte Larven

als Ausgangsmaterial.

Für die in vitro-Entwicklung von Stephanurus dentatus benutzten DOUVRES und TROMBA (1962) ebenfalls vitaminversetzte Medien. Medium SM-26 enthielt doppelte Mengen Schweineleberextrakt und Rinderserum, SM-27 doppelte Mengen autoklavierten Schweineleberextrakt und SM-29 doppelte Mengen nichtautoklavierten Schweineleberextrakt. Das erste Medium war am günstigsten und erbrachte in 15 Tagen das 4. Larvenstadium.

Auch in vitaminversetzten ähnlichen Medien kultivierte DOUVRES (1966) Oesophagostomum dentatum, wobei er in 76, 106 und 125 Tagen lediglich 4 % praeadulte Stadien erreichen konnte.

LELAND (1961, 1963a) verwendete für die Kultur verschiedener Trichostrongylienarten ein Medium (Ae), das aus Kükenembryoextrakt, Serum (Wiederkäuer oder Ratte), Natriumkaseinat, käuflichem Leberkonzentrat, Vitaminzusätzen und Antibiotica bestand. Er beobachtete einen positiven Einfluß des Leberkonzentrats bei 5 % Zusatz zum Medium und gleichzeitigen Vitamingaben auf Entwicklung, Wachstum und Eiproduktion der Würmer. Präzipitatbildung bedeutete teilweisen bis vollständigen Aktivitätsverlust. In diesem Ae-Medium entwickelten sich Cooperia punctata bis zur Ablage unbefruchteter Eier, Ostertagia ostertagi, Ostertagia circumcincta und Cooperia oncophora zum adulten sowie Oesophagostomum radiatum, Nematodirus sp. und Haemonchus spp. zum 4. Stadium. Die adulten Würmer waren allerdings kleiner und brauchten eine längere Entwicklungszeit als in vivo.

In einem etwas abgeänderten Ae-Medium züchtete LELAND (1963b, 1965a und b) Oesophagostomum quadriscinulatum, Cooperia pectinata und Hyostrongylus rubidus. Bei Oesophagostomum quadriscinulatum traten nach 34 Tagen Larven IV und nach 47 Tagen Adulte auf. Bei Hyostrongylus rubidus wurden nach 16 Tagen Larven IV, nach 26 Tagen Praeadulte und nach 60 Tagen Weibchen (mit unbefruchtete Eiern) festgestellt. Cooperia pectinata entwickelte sich in 14 Tagen bereits zu Praeadulten im Kulturmedium und in den Weibchen

fanden sich nach 28 Tagen unbefruchtete Eier.

ECKERT (1967) züchtete in einem modifizierten Ae-Medium nach LELAND die Trichostrongylidenarten Cooperia punctata und Ostertagia leptospicularis von der entscheideten 3. Larve bis zur Geschlechtsreife, Ostertagia ostertagi bis zum 5. und Nematodirus sp. bis zum 4. Stadium. Die Kulturen wurden ständig bewegt, die Bebrütungstemperatur betrug 38°C. Die Entwicklung von Oesophagostomum sp. vom Schwein führte in Medium H (mit Schweineserum) unter einer Gasphase aus 5% CO₂, 5 % O₂ und 90 % N₂ bis zum 5. Stadium. Die von Cooperia punctata in vitro abgelegten Eier waren unbefruchtet. Es wurden käufliche Leberextrakte verwendet.

In einem Medium, das dem von WEINSTEIN und JONES ähnlich war, züchtete SILVERMAN (1959) unter Verwendung eines autoklavierten Schafleberextraktes Haemonchus contortus in 24-30 Tagen zum adulten Stadium. Es gelang ihm (1965) ferner, in einem komplexen Medium aus Kükenembryoextrakt, Rinderleberextrakt, Serum und Natriumkaseinat Oesophagostomum radiatum in 14-25 Tagen zu züchten.

SCHULZ (1963) schließlich widmete sich in unserem Institut der in vitro-Kultur von Oesophagostomum venulosum. In einem Medium aus Kükenembryoextrakt, Hefeextrakt, Schafserum, käuflichem Leberextrakt und Vitaminzusätzen entwickelten sich bei einer Temperatur von 38,5°C die entscheideten 3. Larven zu Larven IV. Er (1967) brachte ferner Haemonchus contortus in einem abgewandelten Medium von WEINSTEIN und JONES zu Larven IV und in einem modifizierten Medium nach DIAMOND und DOUVRES zum praeadulten Stadium. Das optimale Medium bestand aus 30 % Kaninchenembryoextrakt, 15 % Schweineleberextrakt, 10 % Kälberserum und 45 % Nährbrühe. Zwei käufliche Leberextrakte waren Schweine- und Schafleberextrakten unterlegen.

In einem aus 30 % Kükenembryoextrakt, 15 % Schafleberextrakt, 10 % Schweineserum, 45 % einer Nährbrühe und Antibiotica bestehenden Medium brachten SCHULZ und DALCHOW (1967) erstmals Chabertia ovina zum praeadulten Stadium, wenn die Gasphase

5 % CO₂ enthielt. Die 3. bzw. 4. Häutung erfolgte bei Verwendung von Schafleberextrakt am 6. bzw. 31. Tag. Die käuflichen Extrakte erwiesen sich für die Kulturen als zu toxisch. Durch Autoklavieren wurde die Aktivität des Schafleberextraktes teilweise zerstört.

Schließlich brachten SCHULZ und DALCHOW (1969) Oesophagostomum quadrispinulatum in einem ähnlichen Medium bis zur Geschlechtsreife, wenn die Gasphase 5 % CO₂ und 20 % O₂ enthielt. Die ersten Larven IV konnten nach 4 Tagen, die 4. Häutung nach 22 Tagen und einzelne unbefruchtete Eier nach 90 Tagen gefunden werden. Schafleber- und Schweineleberextrakt zeigten keine Wirkungsunterschiede.

Für meine Versuche zur Erprobung der Wirkung von unterschiedlich hergestellten Leberextrakten verwendete ich Chabertia ovina. Über die Entwicklung im Wirtskörper berichtet THRELKELD (1947). 90 Stunden nach der oralen Infektion erfolgt die 3. Häutung der an die Schleimhaut des oberen Colons angehefteten Larven. Die zu Beginn der Infektion 650 µ messenden Larven sind nach 6 Tagen bereits 1040 µ lang und haben eine provisorische Mundkapsel entwickelt. Nach 18 Tagen tritt die Geschlechtsdifferenzierung ein, die bleibende Mundkapsel formt sich und beide Geschlechter messen etwa 2 mm. Die 4. Häutung erfolgt nach 25 Tagen und ab dem 34. Tag sind bei Männchen und Weibchen die Geschlechtsorgane gut entwickelt. Eier erscheinen im Kot 48-54 Tage nach der Infektion. Nach frühestens 6 Tagen sind die aus den Eiern geschlüpften Larven wieder infektionstüchtig. Die adulten Würmer heften sich mit ihrer Mundkapsel an die Schleimhaut des oberen Colons, wobei Teile der Schleimhaut in die Mundkapsel hineingezogen werden. Sie wechseln häufig ihren Sitz und verursachen teilweise erhebliche Zerstörungen der Mucosa.

III. Eigene Untersuchungen

A. Material und Methodik

Bei meinen Versuchen richtete ich mich weitgehend nach der von SCHULZ (1967) sowie SCHULZ und DALCHOW (1967, 1969) hier im Institut angewandten Versuchstechnik. Als Medium verwendete ich das von DIAMOND und DOUVRES (1962) beschriebene, dem die verschiedenen von mir hergestellten Leberextrakte zugesetzt wurden.

Das Larvenmaterial für meine Versuche gewann ich aus dem Kot von mehreren künstlich ausschließlich mit Chabertia ovina infizierten Schafen. Der in Beuteln an den Tieren aufgefangene Kot wurde in Gläsern in der Klimakammer bei 28°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % 10 Tage lang bebrütet. Aus dem Kot wurden nun die Larven III in Trichtern isoliert. Die in ein Reagenzglas abgefüllte Larvensuspension konnte durch mehrmaliges Dekantieren und Aufschwemmen mit 0,7 %iger NaCl-Lösung von Schwebstoffen gereinigt werden. Anschließend ließ ich die Larven durch mehrere Lagen Verbandmull, die in einem Perlongazesieb (Maschenweite 70 μ) lagen, und durch darunterliegendes Baumwollgewebe wandern. Das Sieb mit dem Verbandmull tauchte in einen mit 0,7 %iger NaCl-Lösung gefüllten Trichter ein. Die so gereinigten Larven wurden bis zu ihrer Verwendung in einer phosphatgepufferten NaCl-Lösung (pH 7) in einem mit Aluminiumfolie verschlossenen, etwa zu einem Drittel gefüllten Reagenzglas bei 4°C für 1-5 Monate aufbewahrt.

Vor dem Beimpfen der Medien wurden die Larven zur Abtötung von Bakterien und zur Entscheidung mit einer Natriumhypochloritlösung behandelt, wie es bei WEINSTEIN und JONES (1956) angegeben wird. Ich verwendete dazu eine NaOCl-Lösung mit 13 % aktivem Chlor, von der 0,25 ml zu 40 ml NaCl-Lösung (0,7 %) gegeben wurden. Die Entscheidung der Larven III erfolgte mit 9 ml der verdünnten NaOCl-Lösung in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben innerhalb von 10 Minuten. Anschließend wurde die Larvensuspension für 5 Minuten bei

200 U/min zentrifugiert, die überstehende NaOCl-Lösung mit einer Pipette abgesaugt und die Larven mit 0,7 %iger steriler NaCl-Lösung wieder aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zur Entfernung von NaOCl-Resten dreimal wiederholt. Um vergleichbare Larvenzahlen jeweils in die Medien geben zu können, wurde nach Auszählung das Larvenmaterial in physiologischer NaCl-Lösung so verdichtet, daß 3 Tropfen in der Regel 350-450, beim letzten Ansatz 100-200 Larven enthielten.

Die Herstellung des Kükenembryoextraktes (CEE) erfolgte nach den Angaben von DIAMOND und DOUVRES (1962). Aus 11 Tage lang bebrüteten und für 5 Minuten in Jodalkohollösung gelegten Hühnereiern wurden die Embryonen steril entnommen, mit Hilfe von Kohlensäureschnee sofort eingefroren und anschließend für mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen und mechanischen Zerkleinern der Embryonen versetzte ich sie im Erlenmeyerkolben mit der Extraktionsflüssigkeit. Zu 10 g Embryogewebe kamen 100 ml der Extraktionsflüssigkeit (0,02 n NaOH, die pro 1000 ml noch 1,171 g NaCl enthielt). Das mit der Extraktionsflüssigkeit versetzte Embryogewebe wurde bei täglich mehrmaligem Schütteln für etwa 96 Stunden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Der von den Gewebestandteilen über ein Sieb abgetrennte Extrakt wurde dann über eine EK-Seitzfilterscheibe abgesaugt, seitzfiltriert (EK) und bis zu seiner Verwendung bei -20°C eingefroren.

Schweineserum gewann ich aus dem Blut von Schlachttieren, das nach 2-3 Stunden Stehenlassen bei Raumtemperatur und anschließender Aufbewahrung bis zum nächsten Tag im Kühlschrank bei 2500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, dann über EK-Filter seitzfiltriert und bei -20°C eingefroren wurde.

Für die Gewinnung der Leberextrakte verwendete ich frische Lebern von Schlachtschweinen, die ich noch schlachtwarm mit 0,9 %iger NaCl-Lösung spülte und in 3 Teile teilte. Ein Teil (a) wurde für 3 Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert, der zweite (b) bei -20°C eingefroren und der dritte (c)

fünfmal eingefroren bei -20°C und wieder aufgetaut. Die so vorbehandelten Leberportionen wurden dann mit den entsprechenden Extraktionsmitteln (14 verschiedene) versetzt.

Die Leberextrakte der 1. Gruppe wurden nach der Methode von DIAMOND und DOUVRES (1962) hergestellt. Das in erbsengroße Stücke zerkleinerte Gewebe wurde in einem Erlenmeyerkolben mit dem Extraktionsmittel versetzt (1 Teil Gewebe zu 10 Teilen Extraktionsmittel) und dann für 96 Stunden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Als Extraktionsmittel dienten 0,02 n HCl (Extrakt Nr.1), 0,1 n HCl (2), 0,02 n NaOH (3) und 0,1 n NaOH (4). Nachdem das Gewebe mit dem Extraktionsmittel genügend lange gestanden hatte, wurde der Extrakt abgegossen und über eine Porzellannutsche, die mit einer EK-Seitzfilterscheibe ausgelegt war, abgesaugt und danach über ein EK-Filter seitzfiltriert. Anschließend erfolgte das Einfrieren des Extraktes bei -20°C . Das Absaugen über eine EK-Filterscheibe vor der Seitzfiltration war bei fast allen Leberextrakten nötig, da sonst nach kurzer Zeit die Filterscheibe des Seitzfilters verstopft war.

Die 2. Gruppe der Extrakte bereitete ich modifiziert nach der Methode von WEINSTEIN und JONES (1956) zu. Als Extraktionsflüssigkeiten dienten H_2O dest. (1), 0,9 %ige NaCl-Lösung (6), 1/15 n Kaliumphosphat-Pufferlösung (7) und Earle'sche Lösung (8). Hierbei wurde das Lebergewebe im Verhältnis 1:1 mit dem entsprechenden Extraktionsmittel in einem Starmix-Gerät für 1 Minute homogenisiert, das Homogenat für etwa 2 Std. bei 4°C aufbewahrt und anschließend bei 14000 U/min für 30 Minuten bei 0°C zentrifugiert. Die überstehende rotbraune, trübe Flüssigkeit wurde abgegossen und nacheinander über K_7 - und EK-Filter abgesaugt. Der Versuch, durch Zentrifugieren bei 20000 U/min das Absaugen zu beschleunigen, brachte keinen Erfolg. Auch wenn ich das Verhältnis von Lebergewebe zu Extraktionsmittel 1:2 wählte, verlief der Absaugevorgang nicht schneller. Nach dem Absaugen wurde der Extrakt seitzfiltriert und bei -20°C eingefroren. Bei einigen Versuchen verdünnte ich die Extrakte vor ihrer Verwendung mit sterilem H_2O oder steriler 0,9 %iger

NaCl-Lösung. Den im Verhältnis 1:1 hergestellten Extrakten setzte ich 9 Teile und dem im Verhältnis 1:2 hergestellten Extrakt 8 Teile H_2O bzw. NaCl-Lösung zu.

Bei der 3. Gruppe der Extrakte, die ich nach einem modifizierten Verfahren nach DOUGHERTY (1953) herstellte, wurde das Lebergewebe mit 1/15 n Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7) im Verhältnis 1:1 homogenisiert und nach 2stündiger Lagerung im Kühlschrank bei 14000 U/min zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit Pepsin bzw. Trypsin versetzt. Der mit Pepsin behandelte Extrakt (9) wurde bei konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 2 gebracht, mit Pepsin (10 000 E/g) versetzt (zu 150 ml Extrakt 200 mg Pepsin) und für 24 Stunden bei $38,5^{\circ}C$ in den Brutschrank gestellt. Da der pH-Wert sich während dieser Zeit veränderte, wurde er mehrmals wieder auf pH 2 eingestellt. Danach erfolgten die Neutralisation mit 5 n NaOH, die Zentrifugation für 30 Minuten bei 14 000 U/min, die Seitzfiltration der überstehenden gelblichen Flüssigkeit und schließlich das Einfrieren des sterilen Extraktes bei $-20^{\circ}C$.

Bei der Gewinnung eines weiteren pepsinbehandelten Extraktes wurde das Enzym direkt dem im Verhältnis 1:1 mit Kaliumphosphat-Puffer hergestellten Leberhomogenat zugesetzt. Das Homogenat, das mit HCl auf pH 2 eingestellt und dann mit Pepsin versetzt wurde (zu 300 g Homogenat wurden 1000 mg Pepsin gegeben), war eine dickbreiige Masse, die deshalb durch Zugabe von 100 ml H_2O noch etwas verdünnt wurde. Dieses Homogenat wurde ebenfalls für 24 Std. bei $38,5^{\circ}C$ gehalten, dann neutralisiert, zentrifugiert bei 14 000 U/min für 30 Minuten und der überstehende Extrakt (10) seitzfiltriert.

In gleicher Weise stellte ich auch die mit Trypsin behandelten zwei Extrakte (11 und 12) her mit dem Unterschied, daß hierfür ein pH von 8 nötig war. Für die Extrakte 10 und 12, bei denen also Pepsin bzw. Trypsin zum Homogenat zugesetzt wurde, kamen Lebern zur Verwendung, die nur einmal eingefroren waren. Die Extrakte 9 und 11 wurden dagegen aus allen 3 Arten von vorbehandelter Leber hergestellt. Die enzymbehandelten Extrakte wurden meist in der Konzentration zum

Medium zugesetzt, wie sie gewonnen wurden, nur einige außerdem in verdünnter Form (1 Teil Extrakt verdünnt mit 5 Teilen H_2O dest.).

Bei den bisher angegebenen Leberextrakten handelte es sich um rohe Leberextrakte. Außer diesen wurden auch zwei autoklavierte Leberextrakte (ALE) getestet. Bei der Herstellung des ALE richtete ich mich nach den von NICHOLAS und Mitarb. (1959) gemachten Angaben. Frische Schweineleber, für 24 Std. bei $-20^{\circ}C$ eingefroren, dann bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend für 2 Tage im Kühlschrank gelagert, wurde im Verhältnis 1:1 mit Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) homogenisiert und das Homogenat für 15 Minuten autoklaviert ($1,2 \text{ kg/cm}^2$). Dies blieb über Nacht im Kühlschrank und wurde am nächsten Tag rehomogenisiert sowie bei 14 000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert. Der überstehende Extrakt (13) wurde seitzfiltriert und bei $-20^{\circ}C$ eingefroren. Vor der Mediumzusammenstellung gab ich zu 9 ml ALE durch Millipore-Filter sterilisierte 0,009 ml Folsäurelösung (1 mg Folsäure pro Liter H_2O) hinzu.

Bei einem weiteren ALE wurden das bei $-20^{\circ}C$ eingefrorene Lebergewebe aufgetaut, mit 1/15 n Kaliumphosphat-Puffer im Verhältnis 1:1 homogenisiert und das Homogenat für 5 Minuten autoklaviert ($1,2 \text{ kg/cm}^2$). Nachdem es abgekühlt, im Starmix-Gerät rehomogenisiert und bei 14 000 U/min für 30 Minuten zentrifugiert war, bewahrte ich die überstehende Flüssigkeit über Nacht im Kühlschrank auf, versetzte sie dann mit Ficin (zu 150 ml jeweils 150 mg Ficin) und ließ sie für 12 Stunden bei $20^{\circ}C$ stehen. Anschließend wurde der Extrakt (14) seitzfiltriert und bei $-20^{\circ}C$ eingefroren.

Die nach Angaben von DIAMOND und DOUVRES (1962) hergestellte 1,5fach konzentrierte Nährbrühe besteht aus Trypticase (Baltimore Biological Laboratory, Baltimore, Maryland, USA), Yeast-Extrakt (Difco Laboratories, Detroit/Michigan, USA), Glucose, L-Cystein-Hydrochlorid, Ascorbinsäure, NaCl, KH_2PO_4 und K_2HPO_4 , gelöst in H_2O . Die Brühe wurde für 10 Minuten autoklaviert ($1,2 \text{ kg/cm}^2$) und bis zum Verbrauch bei $-20^{\circ}C$ eingefroren.

Die einzelnen Bestandteile des Mediums wurden erst an dem Tag wieder aufgetaut, an dem ich das Medium zusammenstellte. Das Grundmedium bestand aus 30 % CEE₆, 30 % Nährbrühe (1,5fach), 10 % Schweineserum und 0,5 % Antibiotica (in 1 ml Medium 250 IE Penicillin und 0,25 mg Dihydrostreptomycinsulfat). Diesem Grundmedium wurden 5 %, 15 % und 30 % der verschiedenen Leberextrakte zugesetzt. Die Medien, die 5 % oder 15 % Leberextrakt enthielten, füllte ich mit sterilem H₂O dest. auf 100 % auf. Die für eine 14tägige Kultivierung benötigte Mediummenge stellte ich einen Tag vor Versuchsbeginn zusammen, füllte es in 4,5 ml-Portionen in 16x160 mm große Röhrchen aus Jenaer Glas S 20 mit Gewinde und Aluminiumschraubkapsel mit Gummieinlage ab und lagerte die abgefüllten Medien bei -20°C.

Als Kulturgefäße dienten die gleichen Röhrchen. Vor Gebrauch taute ich das Medium auf und zentrifugierte es für 5 Minuten bei 2000 U/min, weil sich Präzipitat gebildet hatte. Der überstehende Anteil wurde als Kulturmedium verwendet, in 2 ml-Portionen mit Pipetten in die Kulturröhrchen gefüllt und die entscheideten Larven III dazugegeben. Die Röhrchen, deren Deckel zwecks Gasaustausch nur locker aufgesetzt waren, kamen nach der Beimpfung in 2 Liter-Weithalssteilbrustflaschen, die mit Silikonkautschukstopfen verschlossen wurden. Durch 2 Glasrohre mit Wattefiltern, die durch den Silikonstopfen führten, und die mit Gummischlauch und Schlauchklemmen verschlossen waren, konnte eine Begasung der Flaschen erfolgen. Die Gasphase in den Flaschen, bei der 5 % der Luft durch CO₂ ersetzt waren, habe ich jeden Tag erneuert. Dazu wurde die Flasche für kurze Zeit geöffnet, anschließend der Druck in der Flasche mit einer Vakuumpumpe auf 700 Torr erniedrigt (gemessen durch ein angeschlossenes Kapselfedermanometer) und durch Begasung mit CO₂ aus einer Stahlflasche wieder auf 740 Torr erhöht.

Die Bebrütung erfolgte bei leichtgeneigter Haltung der Flaschen im Brutschrank bei 38,5°C. Zweimal wöchentlich erneuerte ich in Anlehnung an WEINSTEIN und JONES (1956) das Medium. Dazu wurden die Larven mit dem Kulturmedium aus den

Kulturröhrchen mit Hilfe einer Pipette in konisch geformte Zentrifugenröhrchen gebracht. Nach etwa 10 Minuten hatten sich die Larven am Boden des Röhrchens abgesetzt, und das alte Medium konnte vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt werden. Mit frischem Medium wurden dann die Larven aufgeschwemmt und in die Kulturröhrchen zurückpipettiert. Nach 6tägiger Kulturperiode wurden die Röhrchen jeden 2. Tag unter einem Planktonmikroskop (Zeiss) durchgemustert und die verschiedenen Entwicklungsstadien geschätzt. Die Dauer des Versuches betrug 14 Tage. Die Larven wurden dann in 10 %iger Formalinlösung abgetötet und die einzelnen Entwicklungsstadien ausgezählt. Bewertungsmaßstab für die einzelnen Kulturen war das Verhältnis der einzelnen Larvenstadien zueinander.

Zum Schutz gegen bakterielle Verunreinigung führte ich das Mischen und Abfüllen der Medien und das Beimpfen und Umsetzen der Kulturen in einer Impfkabine durch, die durch eine UV-Lampe keimfrei gehalten wurde. Außerdem benutzte ich zum Umsetzen durch Hitze sterilisierte Geräte. Trotz dieser Vorsichtsmaßnahmen kam es vor, daß einzelne Röhrchen im Verlaufe der 14tägigen Kulturperiode bakteriell oder durch Pilzwachstum verunreinigt waren, wodurch sämtliche oder ein Teil der Larven abstarben.

Insgesamt führte ich 8 Versuche durch. Von jeder Konzentration (5%, 15% u. 30%) der einzelnen Leberextrakte legte ich je 2 Kulturröhrchen an, bei Ansatz 8 je 3 Röhrchen. Bei 6 Versuchen lief ein auf die gleiche Art hergestellter Leberextrakt als Vergleichsextrakt mit. Die ersten 5 Versuche dienten dazu, alle aufgeführten Leberextrakte einmal zu prüfen. In den letzten 3 Versuchen prüfte ich alle die Extrakte noch einmal, bei denen sich in den vorangegangenen 5 Versuchen 50 % und mehr Larven IV entwickelt hatten. Bei den letzten 3 Ansätzen versuchte ich, auch *Chabertia ovina*-Larven im Grundmedium allein, also ohne Leberextraktzusatz, zu züchten.

B. Ergebnisse

1. Bedeutung der Vorbehandlung der Leber durch unterschiedliche Lagerung vor der Extraktgewinnung

Da nicht bekannt ist, welcher Leberbestandteil in den chemisch undefinierten Medien einen wachstumsfördernden Effekt auf das Larvenwachstum hat, wollte ich durch die Extraktion möglichst viele Stoffe aus den Lebern herauslösen. In dem Lebergewebe, das bei 4°C für 3 Tage gelagert wird, finden sicherlich, ähnlich wie bei der Fleischreifung, fermentative Prozesse statt, durch die bei der anschließenden Extraktion wahrscheinlich mehr Bestandteile herausgelöst werden können, als wenn man frisches Lebergewebe extrahieren würde.

Beim einmaligen bzw. mehrmaligen Einfrieren ging ich von dem Gedanken aus, daß durch den Gefrierprozeß die Zellen zerstört werden und dadurch bei der Extraktion mehr Stoffe freigesetzt werden. Eigenartigerweise hatte die unterschiedliche Vorbehandlung des Lebergewebes aber auf die Wirksamkeit der Leberextrakte kaum einen Einfluß (Tabelle 1). Die Extrakte aus Lebergewebe, das 5mal hintereinander bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut wurde, waren zum Teil etwas ungünstiger als die aus nur einmal eingefrorener oder 3 Tage im Kühlschrank gelagerter Leber.

2. Einfluß der verschiedenen Extraktionsmittel auf die Wirksamkeit des Extraktes

Wie bereits im Abschnitt "Methodik" beschrieben, wurden die Leberextrakte gruppenweise verschieden hergestellt.

In der Gruppe 1 wurde zerkleinertes Lebergewebe mit Säure bzw. Base (0,02n HCl, 0,1n HCl, 0,02n NaOH und 0,1n NaOH) versetzt. Das jeweilige Gemisch blieb für 96 Stunden zur Extraktion im Kühlschrank. Dabei waren die Ergebnisse recht unterschiedlich und wenig klar. Sowohl unter den mit HCl als auch den durch NaOH-Behandlung hergestellten Extrakten waren einige dabei, durch deren Zusatz zum Medium sich 70-85 % der Larven zum 4. Stadium entwickelten, während andere unter 70 %

Behandlung des Leber- gewebes vor der Extrakt- gewinnung	Larvenentwicklung in %				
	Extrakt- Nr.	Mund- kapsel- bildung	Häutungs- stadium	Larven IV	Larven III
3 Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert	3a 5/1	7	15	67	11
	3a 5/2	13	14	51	22
	3a15/1	10	13	51	26
	3a15/2	7	2	83	8
	3a30/1	4	23	63	9
	3a30/2	7	24	55	13
1mal einge- frozen bei -20°C und aufgetaut	3b 5/1	2	9	64	25
	3b 5/2	6	7	52	35
	3b15/1	14	12	53	21
	3b15/2	7	6	54	33
	3b30/1	8	11	58	23
	3b30/2	6	9	45	40
5mal einge- frozen bei -20°C und aufgetaut	3c 5/1	6	8	45	41
	3c 5/2	6	10	42	43
	3c15/1	8	16	43	33
	3c15/2	12	11	40	38
	3c30/1	7	14	25	54
	3c30/2	7	5	37	52

Tabelle 1: Die Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven
in vitro bei unterschiedlicher Lagerung der
Schweineleber vor der Extraktgewinnung
(Protokollauszüge).

Extraktions- mittel	Larvenentwicklung in %				
	Extrakt- Nr.	Mund- kapsel- bildung	Häutungs- stadium	Larve IV	Larve III
0,02n HCl	1a 5/1	3	7	78	12
	1a 5/2	1	2	89	8
	1b 5/1	8	6	78	8
	1b 5/2	8	11	69	12
	1b30/1	2	5	81	12
	1b30/2	1	3	91	4
0,1n HCl	2a 5/1	11	20	48	21
	2a 5/2	6	15	61	18
	2a30/1	6	17	69	8
	2a30/2	6	2	81	11
0,02n NaOH	3a 5/1	7	15	67	11
	3a 5/2	13	14	51	22
	3a30/1	4	23	63	9
	3a30/2	7	24	55	13
	3b 5/1	14	14	52	20
	3b 5/2	1	2	90	7
0,1n NaOH	4a 5/1	6	9	72	12
	4a 5/2	17	7	59	17
	4a30/1	20	4	66	10
	4a30/2	26	5	51	18
	4b15/1	1	3	86	10
	4b15/2	0	3	91	6

Tabelle 2: Die Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven in vitro (Methode nach DIAMOND und DOUVRES (1962) bei Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel (Protokollauszüge).

blieben (Tabelle 2).

In der 2. Gruppe der Extrakte wurden H_2O dest. (5), 0,9 % NaCl-Lösung (6), 1/15 n Kaliumphosphat-Pufferlösung (7) sowie Earle'sche Lösung (8) als Extraktionsmittel verwendet. Dabei bewirkte ein Teil der mit Salzlösungen zubereiteten und vor der Verwendung verdünnten Extrakte bei 5 %igem Zusatz zum Medium eine Entwicklungsrate von 70-85 % Larven IV. Beim Medium 805 (= Earle'sche Lösung als Extraktionsmittel, Leber 5mal eingefroren und getaut, 5 % Extraktzusatz zum Grundmedium) erreichte ich einmal sogar eine Rate von 93 %. Die mit H_2O dest. zubereiteten Leberextrakte waren im Vergleich dazu weniger gut und erbrachten lediglich 60-65 % Larven IV.

Die in der Gruppe 3 durch Pepsinbehandlung hergestellten Extrakte hatten eine deutliche entwicklungsfördernde Wirkung auf die Chabertia-Larven, während die mit Trypsin versetzten Extrakte entwicklungshemmend bzw. toxisch wirkten. So trat bei Zusatz von 5 % eines solchen mit Trypsin behandelten Extraktes nur bei einigen Larven eine Entwicklung zum 4. Stadium ein. Dagegen starben bei 15 % und 30 % Zusatz die Larven III in einigen Medien zu 100 %, in anderen der größte Teil ab (Auszüge aus dem Versuchsprotokoll, Tabelle 3).

Zwei dieser Extrakte (11a, 12b) wurden in fünffacher Verdünnung zum Medium zugesetzt. Sie wirkten dann etwas weniger toxisch, waren aber im Vergleich zu den mit Pepsin hergestellten Extrakten (75-85 % Entwicklung zu Larven IV) diesen unterlegen (Tabelle 4).

3. Bedeutung der Menge des zum Kulturmedium zugesetzten Leberextraktes

Zur Klärung der Frage, ob die Larvenentwicklung von den zum Grundmedium zugesetzten Leberextraktmengen abhängig sei, wurden auch einige Extrakte in verdünnter Form verwendet. Dabei zeigte sich bei denjenigen, die im Verhältnis 1 Teil Lebergewebe zu 10 Teilen Extraktionsflüssigkeit hergestellt wurden, keine deutliche Abhängigkeit der Larvenentwicklung von den zugesetzten Extraktmengen (Gruppe 1 der Leberextrakte). Der

Zusätze zum Leberextrakt	%	zuge- setzte Menge Leber- extrakte	Nr. des Ex- traktes	Larvenentwicklung in %		
				Larven IV	Larven III lebend	Larven III tot
Trypsin	5		11a 5/1	13	57	14
	5		11a 5/2	20	49	19
	15		11a15/1	-	2	98
	15		11a15/2	-	17	83
	30		11a30/1	-	-	100
	30		11a30/2	-	-	100
Pepsin	5		9b 5/1	68	3	21
	5		9b 5/2	52	8	21
	15		9b15/1	61	14	13
	15		9b15/2	62	11	14
	30		9b30/1	33	24	22
	30		9b30/2	11	42	27

Tabelle 3: Die Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven in vitro bei Verwendung von Leberextrakten (Methode nach DOUGHERTY, 1953) unter Zusatz von Trypsin bzw. Pepsin (Protokollauszüge).

Zusätze zum Leberextrakt	% zuge- setzte Menge Leber- extrakt	Nr. des Ex- traktes	Larvenentwicklung in %		
			Larven IV	Larven III lebend	Larven III tot
Trypsin (Extrakt un- verdünnt)	15	11a15/1	-	2	98
	15	11a15/2	-	17	83
	30	11a30/1	-	-	100
	30	11a30/2	-	-	100
Trypsin (Extrakt 5mal ver- dünnt)	15	V11a15/1	44	25	14
	15	V11a15/2	26	32	18
	30	V11a30/1	18	51	14
	30	V11a30/2	20	35	33
Pepsin (Extrakt un- verdünnt)	15	9a15/1	55	10	23
	15	9a15/2	58	6	24
	30	9a30/1	2	41	47
	30	9a30/2	15	28	38
Pepsin (Extrakt 5mal ver- dünnt)	15	V9a15/1	88	6	1
	15	V9a15/2	83	7	1
	30	V9a30/1	79	9	4
	30	V9a30/2	51	21	5

Tabelle 4: Die Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven in vitro bei Verwendung von verdünnten (5mal) und unverdünnten mit Trypsin- bzw. Pepsinzusätzen hergestellten Leberextrakten (Protokollauszüge).

Zusatz von 5 % und 15 % Leberextrakt zum Grundmedium war für die Entwicklung der Larven nur zum Teil günstiger als die Zugabe von 30 %, obwohl auch hier in einigen Fällen gute Erfolge erzielt wurden.

Durch Zugabe von im Verhältnis 1:1 und 1:2 hergestellten Extrakten (Gruppe 2) trat im Medium eine starke Präzipitatbildung auf, die bei höherem Extraktanteil um so stärker war. So entwickelten sich bei 5 % Zusatz nur noch 3-10 % der Larven zum 4. Stadium, während 15 % oder 30 % die Larvenentwicklung verminderten bzw. bei einigen Extrakten sogar alle Larven abtöteten. Wurden diese Extrakte dem Grundmedium in verdünnter Form zugesetzt, wirkten sie nicht mehr hemmend auf die Larvenentwicklung. Mit zunehmender Menge Leberextrakt verringerte sich jedoch die Entwicklung zu Larven IV. Ähnlich waren auch die Verhältnisse bei den mit Pepsin und Ficin zubereiteten Extrakten (Tabelle 5).

4. Wirkung von rohen und autoklavierten Leberextrakten

Von den 2 autoklavierten Leberextrakten (ALE) hemmte der mit Folsäure versetzte die Larvenentwicklung, bei Zusatz von 15 % oder 30 % zum Grundmedium starb sogar der größte Teil der Larven ab. Dagegen war der mit Ficin behandelte ALE in seiner Wirkung wesentlich besser. Wurden 5 % davon zum Grundmedium zugesetzt, so entwickelten sich bis zu 85 %, bei 15 % Zusatz bis zu 75 % Larven IV. Enthielt das Medium 30 % dieses Extraktes, so war der Prozentsatz an Larven IV bedeutend niedriger. Verglichen mit RLE bewährte sich dieser mit Ficin versetzte ALE ebenso wie die rohen Leberextrakte mit entsprechend guten entwicklungsfördernden Eigenschaften. Allgemein kann gesagt werden, daß bei den günstigen Leberextrakten die sich entwickelnden *Chabertia ovina*-Larven IV nach 14tägiger Kultur eine Länge von 950-1000 μ (maximal 1100 μ) erreichten. Es war aber die kritische Beurteilung der Güte eines Leberextraktes in den zu verschiedenen Zeiten hintereinander angesetzten Versuchsreihen deswegen schwierig, weil ja die verwendeten Lebern von verschiedenen Schweinen stammten. Nur durch derartige individuelle Unterschiede lassen sich die teilweise trotz gleicher Zube-

Extraktionsmittel	%	zugesetzte Menge Leberextrakt	Nr. des Extrak- tes	Larvenentwicklung in %			
				Mundkap- selbil- dung	Häutungs- stadium	Larven IV	Larven III
H ₂ O dest.	5		5a 5/1	8	2	66	24
	5		5a 5/2	3	7	66	24
	15		5a15/1	15	8	39	36
	15		5a15/2	7	19	33	41
	30		5a30/1	5	12	8	75
	30		5a30/2	16	7	13	66
Pepsin	5		9b 5/1	1	8	68	24
	5		9b 5/2	8	10	52	30
	15		9b15/1	2	10	61	27
	15		9b15/2	7	6	62	25
	30		9b30/1	7	14	33	56
	30		9b30/2	10	11	11	69
Picin	5		14b 5/1	1	3	88	8
	5		14b 5/2	1	7	86	7
	15		14b15/1	6	6	78	11
	15		14b15/2	4	8	77	12
	30		14b30/1	22	29	27	22
	30		14b30/2	8	25	42	24

Tabelle 5: Abhängigkeit der Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven in vitro von der Menge (5%, 15%, 30%) des zum Medium zugesetzten Leberextraktes.

reitung verschiedenen Ergebnisse erklären. Diese biologischen Schwierigkeiten machten sich teilweise auch in derselben Versuchsreihe bemerkbar.

In 3 weiteren Ansätzen wurden alle die Extrakte noch einmal getestet, die in den ersten 5 Versuchen eine gute Entwicklung von Larven IV bewirkt hatten. Dabei konnten mit einigen Extrakten ähnlich gute, zum Teil noch etwas bessere Ergebnisse erzielt werden (Tabelle 6).

5. Entwicklung im Grundmedium ohne Leberextrakt

Außer in Medien mit Leberextraktzusatz prüfte ich die Entwicklung der *Chabertia ovina*-Larven im Grundmedium ohne Leberextrakt. Dabei zeigte sich, daß auch darin etwa 60-70 % der Larven das 4. Stadium erreichten. Allerdings war bei Zusatz von 15 % oder 30 % H_2O dest. zum Grundmedium die Entwicklung etwas günstiger, wobei die Larven IV auch eine gleichmäßigere Größe aufwiesen (Tabelle 7).

Für alle beschriebenen Versuche ist allgemein zu sagen, daß der pH-Wert der fertig zusammengestellten Medien 6,7-6,8 betrug. Nachdem sich die Larven 3 bzw. 4 Tage in der Kultur entwickelt hatten, war eine Verschiebung der pH-Werte auf 6,3-6,5 eingetreten. Beginnende Mundkapselbildung, Häutungsstadien oder vereinzelt Larven IV konnte ich gewöhnlich am 8. Tag beobachten. Dagegen waren Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Extrakte erst nach 12 Tagen zu beobachten.

Die während der Versuche beobachteten toten Larven, die sich am Ende der Versuche im Medium befanden, waren vor allem Larven III oder Häutungsstadien. Der Prozentsatz toter Larven IV war gering.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Es wurde die Wirkung verschiedener Leberextrakte als Mediumbestandteil auf die in vitro-Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven geprüft.

Extraktions- mittel	Nr. des Ex- traktes	% zuge- setzte Menge Leber- extrakt	Larvenentwicklung in %		
			Larven IV	Zwi- schen- stadien	Larven III
0,02n HCl	1a5	5	89	4	8
0,02n HCl	1b30	30	91	5	4
0,1n NaOH	4b15	15	91	3	6
NaCl-Lösung (0,9%ig)	6b5	5	91	6	3
1/15n Kalium- phosphat-Puf- ferlösung	7a5	5	85	8	7
Earle'sche Lösung	8c5	5	93	4	3
Pepsin	9b5	5	82	8	10
Pepsin(5mal verdünnt)	V9a15	15	88	5	7
Pepsin	10b5	5	83	4	13
Pepsin(5mal verdünnt)	V10b30	30	86	3	11
Ficin	14b5	5	88	4	8

Tabelle 6: Die optimale Wirkung verschiedener Leberextrakte auf die Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven IV (Protokollauszüge).

Grundmedium mit/ ohne Leberextrakt	Nr. des Ex- traktes	Larvenentwicklung in %		
		3.Häutung	Larve IV	Larve III
mit Leber- extrakt	1a5/1	5	80	14
	1a5/2	3	87	9
	10b5/1	1	83	13
	10b5/2	2	80	15
	14b5/1	-	85	13
	14b5/2	6	81	10
ohne Leber- extrakt ohne Leberex- trakt + 15% H ₂ O	0/1	3	57	38
	0/2	2	61	31
	0I/1	4	68	25
	0I/2	2	76	21
ohne Leberex- trakt + 30% H ₂ O	0II/1	3	69	24
	0II/2	4	70	24

Tabelle 7: Die Entwicklung von Chabertia ovina-Larven
in vitro in einem Grundmedium mit/ohne Leber-
extrakt-Zusatz (Protokollauszüge).

Die unterschiedliche Behandlung der Leber vor der Extraktgewinnung hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Wirkung des daraus hergestellten Leberextraktes. Vor allem bestanden keine Unterschiede, wenn die Leber nach der Schlachtung des Tieres sofort bei -20°C eingefroren oder diese für 3 Tage bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurde. In den meisten Literaturangaben wird im Gegensatz dazu empfohlen, die Leber für einige Zeit bei -20°C einzufrieren.

Ein zu hoher Gehalt des Mediums an Leberextrakt hatte bei meinen Versuchen eine entwicklungshemmende bzw. toxische Wirkung. Auch WEINSTEIN und JONES (1959) stellten eine Verzögerung der Entwicklung von *Nippostrongylus muris* fest, wenn mehr als 0,1 % eines käuflichen Leberextraktes dem Medium zugesetzt wurde. Außerdem gibt STOLL (1953) an, daß in reinem Leberextrakt *Neoaplectana glaseri* zwar wächst, die Entwicklung aber günstiger ist, wenn nur 10 % Leberextrakt im Medium enthalten sind.

SILVERMAN (1959) schreibt dem rohen Leberextrakt eine toxische Wirkung zu und verwendete deshalb autoklavierten Schafleberextrakt. In meinen Versuchen mit Schweineleberextrakt konnte ich diese Beobachtung nicht bestätigen. Ich erreichte mit Rohleberextrakten vielfach dieselbe Larvenentwicklung wie mit Ficin versetztem autoklaviertem Extrakt. Dagegen verursachten konzentrierte Extrakte im Kulturmedium stets Präzipitate, die ihrerseits sich toxisch auf die Larven auswirkten. Bei entsprechender Verdünnung kam es nicht zur Auflockerung. Auch diese an einem großen Kulturmateriale festgestellten Beobachtungen widersprechen den Mitteilungen von STOLL (1953, 1961), der gerade den sich bildenden Präzipitaten eine helminthenfördernde Wirkung zuschreibt.

Was den zeitlichen Ablauf der allmählichen Entwicklung der in die Kultur eingebrachten Larven III über die Mundkapselbildung und die Häutung zur Larve IV betrifft, hatten SCHULZ und DALCHOW (1967) bereits am 6. Tag die Häutung beobachtet. In meinen Versuchen traten jedoch sowohl Mundkapselbildung als auch Häutung frühestens am 8. Tag auf. Ob diese Verzögerung auf das andere Larvenausgangsmaterial zurückzuführen

ist oder durch eine Mediumkomponente verursacht wurde, läßt sich nicht klären.

Obwohl gleiche Versuchsbedingungen und gleiche Leberextrakte von mir angewendet wurden, war die Entwicklung zur Larve IV auch in den einzelnen Versuchen oft recht unterschiedlich. Dies könnte darin begründet sein, daß für die einzelnen Versuche Lebern von verschiedenen Tieren verwendet wurden. Eventuell haben auch Alter, Geschlecht, Art der Fütterung und der Ernährungszustand des Spendertieres einen Einfluß auf die Wirkung des Extraktes. Aber auch die für die Herstellung und Filtration benötigte Zeit und die dabei herrschenden Temperaturen können einen gewissen Einfluß gehabt haben, worauf auch STOLL (1953, 1959) hinweist. Die Extraktgewinnung soll in möglichst kurzer Zeit und bei niederen Temperaturen vor sich gehen. Wegen der schlechten Filtrierbarkeit der Schweine-Leberextrakte hatte ich jedoch vielfach längere Zeit verwenden müssen.

Das Alter der Larven hatte erstaunlicherweise keinen Einfluß auf ihre Entwicklung im Medium. Ich verwendete bei meinen Versuchen sowohl Larven, die nur 2 Wochen im Kühlschrank gelagert hatten, als auch solche, die 5 Monate aufbewahrt worden waren. Auch DOUVRES (1962) machte dieselbe Beobachtung mit 1 Woche bis zu 6 Monate alten Larven.

Da sich die Larven auch im Grundmedium ohne Leberextraktzusatz teilweise bis zu 70 % zum 4. Stadium entwickelten, scheint ein Zusatz von Leberextrakt zumindest für diesen Entwicklungsabschnitt nicht unbedingt notwendig zu sein. Allerdings entwickelten sich im Grundmedium mit Zusatz von günstig wirkenden Leberextrakten 85 %, in einigen Fällen sogar 90 % Larven IV. Auch waren diese Larven etwas größer und hatten ein gleichmäßiges Wachstum.

Diese Beobachtungen werden in der Literatur teilweise nicht bestätigt, teilweise finden sich ähnliche Feststellungen. So fand nach SCHULZ (1963) keine Oesophagostomum venulosum-Larvenentwicklung statt, wenn dem von ihm verwendeten Grundmedium kein Leberextrakt zugesetzt wurde. WEINSTEIN und

JONES (1957) hatten mit *Nippostrongylus muris* die besten Ergebnisse bei Weglassen des Leberextraktes. Allerdings erhöhten die Autoren in diesem Fall den Zusatz von Embryoextrakt.

Die in vitro-Kultur parasitischer Nematoden der Haustiere stellt, wie meine Versuche erneut zeigten, ein recht interessantes und für die spätere praktische Anwendung in Form einer prophylaktischen Vakzinierung wichtiges, allerdings auch schwieriges und komplexes Problem dar.

V. Zusammenfassung

Es wurde die Wirkung von auf verschiedene Art hergestellten Schweineleberextrakten auf die in vitro-Entwicklung von *Chabertia ovina*-Larven geprüft. Das Grundmedium bestand aus 30 % Kükenembryoextrakt, 10 % Schweineserum, 30 % Nährbrühe und Antibiotica. Es wurden versuchsweise 5 %, 15 % und 30 % der unterschiedlichen Leberextrakte zugesetzt, wobei ein Zusatz von 5 % oder 15 % günstiger wirkte als 30 %. Von den verwendeten Leberextrakten zeigten nur einige eine deutliche entwicklungsfördernde Wirkung, und zwar waren das die Extrakte 1a15 und 1b30 (Extraktionsmittel 0,02 n HCl), 4b15 (Extraktionsmittel 0,1 n NaOH), 8c5 (Extraktionsmittel Earle'sche Lösung), 9b5, V9a15, 10b5, V10b30 (Pepsinzusatz) und 14b5 (mit Ficinzusatz). Bei Verwendung dieser Extrakte als Zusatz zum Grundmedium entwickelten sich darin innerhalb von 14 Tagen 75-85 % der Larven zum 4. Stadium. Im Gegensatz dazu wirkten die mit Folsäurezusatz und die durch Trypsinzusatz hergestellten Leberextrakte ausgesprochen toxisch auf die *Chabertia ovina*-Larven.

Research on the effect of different pig liver extracts on the development of *Chabertia ovina* larvae in vitro.

Summary

The effect of differently prepared pig liver extracts on in vitro cultivation of *Chabertia ovina* larvae was tested. The basic medium consisted of 30 % chick embryo extract, 10 % pig serum, 30 % nutrition broth and antibiotics.

For the test 5 %, 15 % and 30 % of the differently prepared liver extracts were added, showing that better results were obtained, when 5 % or 15 % than 30 % was added. Only some of the used liver extracts had a distinctly stimulating effect on the development, namely the extracts 1a15, 1b30 (liver extracted with 0,02 n HCl), 4b15 (0,1 n NaOH), 8c5 (Earle's solution), 9b5, V9a15, 10b5, V10b30 (with a pepsin admixture) and 14b5 (with a ficin admixture).

When using these extracts as admixture to the basic medium, 75-80 % of the larvae developed to the fourth stage within 14 days.

In contrast to these the liver extracts which had been made with an admixture of folic acid and those made by trypsin admixture had a toxic effect on the *Chabertia ovina* larvae.

VI. Literaturverzeichnis

1. Diamond, L.S., F.W.Douvres (1960): Cultivation of parasitic stages of the swine nematodes *Hyostrongylus rubidus* and *Oesophagostomum quadrispinulatum* (*O.longicaudum*) free of microbial associates.
J.Parasit. 46 (Suppl.), 25
2. Diamond, L.S., F.W.Douvres (1962): Bacteria-free cultivation of some parasitic stages of the swine nematodes *Hyostrongylus rubidus* and *Oesophagostomum quadrispinulatum* (*O.longicaudum*).
J.Parasit. 48, 39-42
3. Dougherty, E.C. (1950): Some sources and characteristics of the heat-labile nutritional requirement(s) of the nematode *Rhabditis briggsae*.
Anat.Rec. 108, 514
4. Dougherty, E.C. (1951): The axenic cultivation of *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). II. Some source and characteristics of "Faktor Rb".
Expl Parasit. 1, 34-45
5. Dougherty, E.C. (1953): The axenic cultivation of *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon 1949 (Nematoda: Rhabditidae). III. Liver preparations with various supplementation.
J.Parasit. 39, 371-380
6. Dougherty, E.C., J.C.Raphael jr., C.H.Alton (1950): The axenic cultivation of *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae). I Experiments with chick embryo juice and chemically defined media.
Proc. helminth. Soc.Wash. 17, 1-10
7. Dougherty, E.C., E.L.Hansen (1956): A synthetic basal complement to liver medium for the axenic cultivation of the nematode *Caenorhabditis briggsae*.
J.Parasit. 42 (Suppl.), 17
8. Dougherty, E.C., E.L.Hansen, W.L.Nicholas, J.A.Mollett, E.A.Yarwood (1959): Axenic cultivation of *Caenorhabditis briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with unsupplemented and supplemented chemically defined media. *Ann. N.Y. Acad., Sci.* 77, 176-217
9. Douvres, F.W. (1962): The in vitro cultivation of *Oesophagostomum radiatum*, the nodular worm of cattle. I. Development in vitamin-supplemented and nonsupplemented media.
J.Parasit. 48, 311-20

10. Douvres, F.W. (1966): In vitro growth of *Oesophagostomum dentatum* (Nematode: Strongyloiden) from third-stage larvae to adults with observations on inhibited larval development. *J.Parasit.* 52, 1033-1034
11. Douvres, F.W., F.G. Tromba (1962): The development of *Stephanurus dentatus* Diesing 1839, to fourth stage in vitro. *J.Parasit.* 48, 269
12. Eckert, J. (1967): In vitro-Entwicklung invasionsfähiger Nematoden-Larven zu parasitischen Stadien. *Z.ParasitKde.* 29, 242-274
13. Hansen, E.L., P.H. Silverman, E.J. Buecher jr. (1966); Development of *Haemonchus contortus* in media designed for studies on *Caenorhabditis briggsae*. *J.Parasit.* 52, 137-140
14. Jackson, G.J. (1962): The parasitic nematode, *Neoaplectana glaseri*, in axenic culture, II. Initial results with defined media. *Expl Parasit.* 12, 25-32
15. Jones, M.F., P.P. Weinstein (1957): The axenic cultivation of *Nematospiroides dubius*. *J.Parasit.* 43 (Suppl.), 46
16. Leland jr., S.E. (1961): The in vitro cultivation of the parasitic stages of *Cooperia punctata*, *Cooperia onchophora*, *Ostertagia ostertagi*, and *Ostertagia circumcincta*. A preliminary report. *J.Parasit.* 47 (Suppl.), 21
17. Leland jr., S.E. (1962a): Studies on the in vitro growth of parasitic nematodes. I. Complete or partial parasitic development of some gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. *J.Parasit.* 49, 600-611
18. Leland jr., S.E. (1963b): In vitro cultivation of fourth and fifth stages of the swine nodular worm *Oesophagostomum quadrispinulatum*. *J.Parasit.* 49 (Suppl.), 58-59
19. Leland, S.E. (1965a): *Hyostrongylus rubidus*. In vitro cultivation of the parasitic stages including the production and development of eggs through five cleavages: A preliminary report. *J.Parasit.* 51 (Suppl.), 47

20. Leland, S.E. (1965b): *Cooperia pectinata*. In vitro cultivation of the parasitic stages including egg production: A preliminary report. *J.Parasit.* 51 (Suppl.), 46
21. Nicholas, W.L., E.C.Dougherty, E.L.Hansen (1959): Axenic cultivation of *Caenorhabditis briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 77, 218-236
22. Sayre, F.W., E.Hansen, T.J.Starr, E.A.Yarwood (1961): Isolation and partial characterization of a growth-control factor. *Nature, Lond.* 190, 1116
23. Schulz, H.-P. (1963): Versuche zur in vitro-Züchtung von *Oesophagostomum venulosum*. *Vet.-med. Diss. FU-Berlin*
24. Schulz, H.-P. (1967): Versuche zur Kultivierung der parasitischen Larvenstadien von *Haemonchus contortus* in vitro. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 80, 89-96
25. Schulz, H.-P., W.Dalchow (1967): Versuche zur Kultivierung der parasitischen Larvenstadien von *Chabertia ovina* (Fabricius, 1788) in vitro. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 80, 410-415
26. Schulz, H.-P., W.Dalchow (1969): Kultivierung der parasitischen Larvenstadien von *Oesophagostomum quadrispinulatum* (Marcone, 1901) in vitro. *Berl. Münch. tierärztl. Wschr.* 82, 143-147
27. Silverman, H.P. (1959): In vitro cultivation of the histotrophic stages of *Haemonchus contortus* and *Ostertagia* spp. *Nature, Lond.* 183, 197
28. Silverman, H.P. (1965): In vitro procedures for parasitic helminths. *Adv. Parasit.* 3, 159-222
29. Stoll, N.R. (1940): In vitro conditions favoring ecdysis at the end of the first parasitic stage of *Haemonchus contortus*. *J. Parasit.* 26 (Suppl.), 16-17
30. Stoll, N.R. (1953): Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. *J.Parasit.* 39, 422-444

31. Stoll, N.R. (1959): Conditions favoring the axenic culture of *Neoaplectana glaseri*, a nematode parasite of certain insect grubs. Ann. N.Y. Acad. Sci. 77, 126-136
32. Stoll, N.R. (1961): Favored RLE for axenic culture of *Neoaplectana glaseri*. J. Helminth. R.T. Leiper Suppl., 169-174
33. Threlkeld, W.L. (1947): Progress report on the parasitic stages of *Chabertia ovina*. J. Parasit. 33 (Suppl.), 12
34. Weinstein, P.P., M.F. Jones (1956): The in vitro cultivation of *Nippostrongylus muris* to the adult stage. J. Parasit. 42, 215-236
35. Weinstein, P.P., M.F. Jones (1957): The development of a study on the axenic growth in vitro of *Nippostrongylus muris* to the adult stage. Am. J. trop. Med. Hyg. 6, 480-484
36. Weinstein, P.P., M.F. Jones (1959): Development in vitro of some parasitic nematodes of vertebrates. Ann. N.Y. Acad. Sci. 77, 137-162

Für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Unterstützung danke ich Herrn Prof. Dr. J. Boch herzlich.

Mein Dank gilt auch allen Angehörigen des Instituts, die mir bei der technischen Ausführung der Arbeit behilflich waren, insbesondere Fräulein B. Nordhaus. Ferner gilt mein Dank Herrn Dr. Schulz, dessen Anregungen und fachliche Beratung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Lebenslauf

Am 30. Mai 1938 wurde ich als Sohn des Angestellten Rudolf Gröning und seiner Ehefrau Klara, geb. Schulze, in Berlin geboren.

Von 1944 bis 1952 besuchte ich die Grundschule in Rathsdorf und Altranft, anschließend die Geschwister-Scholl-Oberschule in Bad Freienwalde/Oder, wo ich 1956 die Reifeprüfung ablegte. Nach einer 2-jährigen Lehre als Chemielaborant im VEB-Berlin Chemie war ich bis 1960 in diesem Betrieb tätig. Im WS 1961 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, das ich im Mai 1967 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit 1. 8. 1968 bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Parasitologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität tätig.

